

التضاد الحيوي للبكتريا *Bacillus subtilis* على المسببات المرضية الفطرية في التربة

آمال عباس محمد الفخري

قسم علوم الحياة - كلية العلوم للبنات - جامعة بغداد

المستخلص

أجريت هذه الدراسة الأولية لمعرفة التأثير التضادي للبكتريا *Bacillus subtilis* ضد بعض فطريات التربة الممرضة للنبات داخل المختبر. عند تنمية البكتريا مع الفطريات على الوسط الزراعي N.A. كانت أقطار المستعمرات الفطرية (38 و 44 و 38.6) ملم مقارنة بمعاملة السيطرة (57 و 62.3 و 50) ملم للفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* و *F.oxysporum* على التوالي، كما أحدثت نسب تثبيط بلغت (34 و 30 و 23)% للفطريات نفسها أعلاه. أما على الوسط PDA فبلغت (47.8 و 48.3 و 46.6) ملم والسيطرة (57.6 و 61 و 64.3) ملم على التوالي، كما بلغت نسب التثبيط (17 و 22 و 28)% بالتتابع. ظهر التأثير معنويًا على كلا الوسطين، كما أظهر رشح البكتريا تأثيرًا معنويًا أيضًا وبلغ معدل قطر المستعمرة 4.5 ملم و 0.5 ملم عند التركيز 10% وللظفرين *R. solani* و *F. solani* على التوالي، أما عند التركيز 20% فقد بلغ 1.8 ملم للفطر *R. solani* في حين ثبت نمو الفطر *F. solani* تمامًا عند هذا التركيز. تراوحت النسبة للتثبيط بين 91.6 و 99.3% عند التركيز 10% و 96.3 و 100% عند التركيز 20% لكل من الفطرين *R. solani* و *F. solani* بالتتابع.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(3) : 7 - 12, 2005

Al-Fakhri

THE ANTAGONISTIC EFFECT OF *BACILLUS SUBTILIS* AGAINST CERTAIN SOIL BORNE FUNGI

A. A. M. Al-Fakhri

College of Sciences for Women – University of Baghdad

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* against three pathogenic soil borne fungi *in vitro*, under laboratory condition. The diameters of the fungal colonies on nutrient agar were (38, 44, 38.6)mm comparing with control (57, 62.3, 50)mm for *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *F.oxysporum*, respectively. The inhibition percentages were 34, 30, 23 % for the fungi, respectively. The colony diameters on PDA were (47.8, 48.3, 46.6)mm whereas the colonies of the control were (61, 57.6, 64.3) mm diameters, respectively and the percentages of inhibition were (22, 17, 28)%, respectively. The effect was highly significant on both media. The use of bacterial extraction revealed a significant effect on the growth of *R. solani* and *F. solani* which were 4.5 and 0.5 mm, respectively with 10% concentration. The growth of *R. solani* was 1.8 mm whereas the growth of *F. solani* was inhibited completely with 20% concentration. The percentage of inhibition was 91.6 and 99.3% with 10% concentration and 96.3 and 100% with 20% concentration for *R. solani* and *F. solani*, respectively.

المقدمة

إن أسلوب إدارة المرض باستعمال المـوـاد الكيماوية تعد من الطرائق غير العملية في الوقت الحاضر بسبب ظهور السلالات المقاومة للمبيدات الفطرية فضلاً على ظهور المتبقيات الكيماوية في السلسلة الغذائية ومشاكل التلوث البيئي (8 و 12)، هنالك عدة أنواع من الأحياء المجهرية استخدمت كمضادات وبشكل تجاري تجاه الفطريات الممرضة للنبات في العديد من دول العالم، ومن هذه الأحياء :

تعد العديد من فطريات التربة التي تقطن في منطقة حول الجنور من المسببات المرضية المهمة لعدد كبير من النباتات الاقتصادية، كمرض الذبول الفيوزاريومي على القرنفل الذي يسببه الفطر *Fusarium oxysporum* والخسائر الاقتصادية البالغة التي يحدثها سنوياً في الولايات المتحدة الأمريكية (15). كما أن أنواع الفطر *Fusarium* مسؤولة عن العفن الجاف للبطاطة حتى تحدث ظروف خزن مبردة.

* تاريخ استلام البحث 2004/10/12 ، تاريخ قبول البحث 2005/3/13

فحصه بالمجهر ومشاهدة الصنات المميزة لهذا الفطر ، بعدها حفظ عند درجة 5°م.

(ب) الفطر *Fusarium solani*

استخدمت نماذج من جنور وقواعد سيقان نبات القرنفل المصابة بمرض تعفن جنور وقواعد السيقان تم الحصول عليها من أحد المشاتل في عزل هذا الفطر حيث قطعت النماذج إلى قطع صغيرة بطول 0.5-1 سم، عقمت وغسلت وحضنت بالطريقة المذكورة في الفقرة (أ) ثم شُخصت بالاستناد إلى المفتاح التصنيفي (3).

(ج) الفطر *Fusarium oxysporum*

تم الحصول على مزرعة نقية من إحدى العزلات المرضية لهذا الفطر من مختبر الأمراض النباتية التابع لقسم وقاية النبات في كلية الزراعة - جامعة بغداد.

عزل البكتريا *Bacillus subtilis*

عزلت بكتريا التضاد الحيوي من التربة في منطقة الجنور (Rhizosphere) من جنور نباتات الطماطم السليمة أو المصابة وعمل منها معلق بكتيري وذلك بأخذ 1 غم من التربة ووضعها في أنبوبة اختبار حاوية على 10 مل ماء مقطر معقم لنحصل على التخفيف 10^{-1} ، ومن هذا التخفيف تم نقل 1 مل إلى أنبوبة اختبار ثانية وأكمل الحجم إلى 10 مل لنحصل على التخفيف 10^{-2} ، وهكذا كررت العملية للحصول على سلسلة من التخفيف والتي تضمنت 10^{-3} ، 10^{-5} ، 10^{-7} لغرض انتخاب التركيز الملائم ، ثم سحب 0.1 مل من كل تخفيف ووضعت في أطباق بتري معقم قطر 9 سم ، بعدها سكبت الأوساط الزراعية NA والـ PDA ، وأستخدم ثلاث مكررات لكل معاملة.

حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 °م لمدة 48 ساعة حتى ظهور المستعمرات والتي تم تشخيصها بعد إجراء كافلة الاختبارات المجهرية والكيموحيوية عليها وحسبما بينه Gibbons و (4) Buchanan.

التضاد البكتيري الفطري

(أ) على الوسط الزراعي N.A

استخدمت المستعمرة البكتيرية *Bacillus subtilis* بعمر يومين ودرس تداخلها مع الفطريات *F. solani* ، *F. oxysporum* و *R. solani* في أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على الأوساط الزراعية Nutrient agar (N A) حيث استعملت طريقة Dual culture technique وذلك بتقسيم الطبق إلى نصفين ، زرعت البكتريا في النصف الأول بطريقة التخطيط (Streaking) باستعمال أبصرة التفتيح ذات العروة Loop full وفي النصف الثاني من الطبق وضع

Gliocladium virens G. 21 و *Tricoderma harzianum* KRL-AG2 و *Candida oleophla* 182 وكتل البكتريا *Pseudomonas fluorescens* EG 1053 و *P. Syringae* ESC10 and ESC 11 و *Bacillus subtilis* و *Bulkolderia cepacia* و GBO3 and MBI 600 (5 و 9). فالبكتريا التابعة للجنس *Bacillus* تعد من أحياء التربة والتي تتواجد بصورة عامة حول منطقة الجنور (14). و في بيئات مختلفة كما إن تواجدها وبقائها يعود وبشكل كبير إلى تكوينها للابواغ الداخلية (endospores) التي تستطيع مقاومة الأشعة فوق البنفسجية و الجفاف والحرارة والمذيبات العضوية (10).

إن بعض أنواع الـ *Bacillus* مثل *B. thuringiensis* و *B. sphaericus* تنتج بعض المركبات ذات التأثير السمي في يرقات الحشرات (10). كما إن هنالك عدد من التقارير أشارت إلى تأثير أنواع من الـ *Bacillus* ومن ضمنها الـ *B. subtilis* في السيطرة على العفن الأخضر وعفن قواعد السيقان على الحمضيات (13).

أشار Montealegre وآخرون (10) إلى إن البكتريا *B. subtilis* لها تأثير تضادي ضد الفطر *Rhizoctonia solani* على الطماطم نظراً لانتشار الفطريات *Fusarium oxysporum* و *F. solani* و *Rhizoctonia solani* في الترب ولوجود بعض الدراسات حول مهاجمتها لجنور بعض النباتات الاقتصادية وإحداث الأمراض النباتية عليها (1).

ونظراً لقلّة الدراسات في القطر حول استعمال البكتريا *Bacillus subtilis* ضد هذه المجموعة من الفطريات ، أجرينا هذه الدراسة التي هدفت إلى التعرف على تأثير هذه البكتريا في النمو الشعاعي لهذه الفطريات وكذلك معرفة آلية التضاد البكتيري على هذه الفطريات.

المواد وطرائق العمل

عزل الفطريات

(أ) الفطر *Rhizoctonia solani* :

تم عزل هذا الفطر باستخدام قطع من جنور بادرات القرنبيط المصابة بمرض سقوط البادرات (Damping-off) وبعد جلبها إلى المختبر غمرت بمحلول هايوكلورات الصوديوم 5% لمدة خمس دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ووضعت في أطباق بتري تحتوي على وسط اكار البطاطسة والـ *Potato dextrose agar* (PDA) وحضنت عند درجة 25 °م لمدة أربعة أيام ثم فحصت وشخصت حيث تم التأكد إن ما عزل هو الفطر *R. solani* بعد

الطبق فترك دون أن يلقح بالبكتيريا ، عملت ثلاث مكررات لكل معاملة وبعد 6 أيام من زرع الفطريات قيست أقطار المستعمرات الفطرية ومنها حسبت النسبة المئوية للتنشيط باستخدام المعادلة الآتية حسبما أوضحها Montalegre وآخرون (10):

$$\% \text{التنشيط} = [1 - (\text{قطر النمو الفطري لمعاملة البكتيريا} / \text{قطر النمو الفطري لمعاملة السيطرة})] \times 100$$

الوسط الزراعي السائل (N B) Nutrient growth
بعدها وزعت على أنابيب النبد المركزي وحضنت في درجة حرارة 25⁰ م لمدة 48 ساعة (10) .
7- خبذت مركزيا بمقدار 6000 دورة بالدقيقة ، أهمل الرايب ثم مرر الراشح خلال ورق ترشيح قطر 0.2 ملي مايكرون (Millipore) بمساعدة جهاز التفريغ الهوائي ، أخذ الراشح وأضيف إلى الوسط PDA بتركيز 10% ، 20% وذلك بأخذ 10 و 20 مل من الراشح وأكمل الحجم إلى 100 مل على التوالي ، صببت في أطباق بتري قياس 9 سم وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز إضافة إلى معاملة السيطرة التي تركت دون إضافة الراشح .

8- زرع قرص قطره 2.5 ملم من كل من الفطريين *Rhizoctonia* و *Fusarium solani* في مركز الطبق ، حضنت الأطباق لمدة خمسة أيام في درجة 25⁰ م ، ثم أخذت النتائج بقياس متوسط القطرين المتعامدين من كل مستعمرة فطرية .

نفذت التجربة باستخدام التصميم تام التعشبية وحلت النتائج احصائيا باستخدام اختبار t واختبار دنكن متعدد الحدود .

النتائج والمناقشة

تأثير الخلايا البكتيرية في النمو الفطري :

عند تنمية البكتيريا والفطريات على الوسط الزراعي N.A أظهرت النتائج تأثيرا واضحا للبكتيريا *Bacillus subtilis* في النمو الشعاعي للفطريات *solani* و *F.oxysporum* مقارنة بمعاملة السيطرة ، وقد كانت الفروق عالية المعنوية باحتمال 0.01 لجميع هذه الفطريات ، كما أحدثت هذه البكتيريا نسب تنشيط تراوحت بين 23% و 34% غير أن الفروق في نسب التنشيط لم تكن معنوية بين هذه الفطريات (جدول 1) . أما على الوسط PDA فقد أظهرت البكتيريا تأثيرا معنويا عاليا باحتمال 0.01 للفطر *solani* وتأثيرا معنويا باحتمال 0.05 للفطر *F. oxysporum* ، أما بالنسبة للفطر *F. solani* فلم يكن التأثير معنويا من الناحية الإحصائية ، كما أحدثت

قرص من كل فطر قطره 2.5 ملم قلع من المزارع الفطرية بعمر 7 أيام بواسطة الناقب الفليني ومن ثم رفعه بالابرة ووضع في مركز النصف الثاني من الطبق وعلى بعد حوالي 2.5 سم من حافات المزرعة البكتيرية ، أما معاملة السيطرة فقد وضع القرص في مركز النصف الثاني من الطبق ، أما النصف الأول من

(ب) على الوسط الزراعي PDA

اتبعت نفس خطوات العمل المبينة في الفقرة (أ) أعلاه . وتم قياس النمو الفطري والنسبة المئوية للتنشيط .

استخلاص الراشح البكتيري

1- تم تلقح الوسط الزراعي السائل Nutrient growth (NB) ببكتيريا *Bacillus subtilis* ورج الوسط جيدا لكي تتوزع الخلايا البكتيرية بانتظام .
2- تم إجراء سلسلة من التخفيف العشرية وذلك عن طريق نقل 1 مل من الوسط الملحق بواسطة ماصة معقمة إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم لنحصل على التخفيف 10⁻¹ ومن هذا التخفيف تم نقل 1 مل إلى أنبوبة اختبار ثانية وأكمل الحجم إلى 10 مل لنحصل على التخفيف 10⁻² وهكذا كررت العملية عدة مرات للحصول على التخفيفات 10⁻⁸ و 10⁻⁹ . أجريت سلسلة التخفيف هذه من الوسط الملحق بالبكتيريا والمحضنة في درجة حرارة 25⁰ م .

3- بعدها تم نقل 1 مل من كل من التخفيف الأخيرة إلى أطباق بتري معقمة مع مراعاة تحضير طبقين لكل تخفيف .

4- تم أضيف إلى كل طبق كمية كافية من الوسط الزراعي الصلب Nutrient agar والمبردة إلى درجة حرارة 45⁰ م ، ثم خلطت محتويات كل طبق جيدا وذلك بتحريك الطبق بشكل رقم (8) ، بعدها تركت الأطباق لتتصلب .

5- وضعت الأطباق بالحاضنة بوضع مقلوب في درجة 25⁰ م لليوم التالي .

6- أُنْتُخِبَ التخفيف المناسب الذي يظهر عدد من المستعمرات يتراوح بين (30-300) مستعمرة بالطبق الواحد ، ثم تم حساب متوسط عدد المستعمرات بالطبق الواحد .

وأخيرا تم حساب عدد الخلايا في 1 مل وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف المستعمل ، عدل تركيز اللقاح ليصبح 5×10⁹ وحدة خلية بكتيرية لكل 1 مل ، حضر منها 100 مل في

البكتريا نسب تثبيط تراوحت بين 17 % و 28% غير أن الفروق في نسب التثبيط بين الفطريات الثلاث لم تكن معنوية (جدول 2).

جدول 1. تأثير بكتريا التضاد الحيوي *Bacillus subtilis* في نمو فطريات الدراسة على الوسط (N.A)

اسم الفطر	النمو الشعاعي للفطر (ملم) معاملة التضاد	النمو الشعاعي للفطر (ملم) (معاملة السيطرة)	% للتثبيط النمو الشعاعي
<i>R. solani</i>	38 **	57	34 a
<i>F. solani</i>	44 **	62.3	30 a
<i>F. oxysporum</i>	38.6 **	50	23 a

** معنوية باحتمال 0.01.

الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية.

جدول 2. تأثير بكتريا التضاد الحيوي *Bacillus subtilis* في نمو فطريات الدراسة على الوسط PDA

اسم الفطر	النمو الشعاعي للفطر (ملم) (معاملة التضاد)	النمو الشعاعي للفطر (ملم) (معاملة السيطرة)	% للتثبيط
<i>R. solani</i>	47.8 **	61	22 a
<i>F. solani</i>	48.3 ^{NS}	57.6	17 a
<i>F. oxysporum</i>	46.6 *	64.3	28 a

* معنوية باحتمال 0.05

** معنوية باحتمال 0.01 و NS غير معنوية

الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية.

التركيزين 10 % و 20% على التوالي بالنسبة للفطر *F. solani*.

كانت الفروق معنوية جدا باحتمال 0.01 بين معاملة كل تركيز ومعاملة السيطرة لكلا الفطرين، كما ظهرت فروق معنوية جدا بين التركيزين 10% و 20% و معاملة السيطرة في نسبة تثبيط الفطر *R. solani*، وقد حصل فرق معنوي أيضا بين نسبتي التثبيط للفطر *R. solani*، أما الفطر *F. solani* فلم يكن هناك فرق معنوي بين التركيزين 10% و 20%، ولكن كان هناك فرق معنوي بين كل من التركيزين المذكورين ومعاملة السيطرة.

خلص الراشح البكتيري في النمو الفطري

أشارت نتائج الدراسة الموضحة في جدول (3) إلى أن لراشح البكتيريا *Bacillus subtilis* تأثيرا واضحا في النمو الشعاعي للفطرين *R. solani* و *F. solani*. وفي النسبة المئوية لتثبيط نموها، فبالنسبة للنمو الشعاعي ظهر انحسارا واضحا لنمو الفطرين والذي بلغ (1.8 و 4.5) ملم عند التركيزين 10% و 20% على التوالي للفطر *R. solani* و (0.5 و 0) ملم عند التركيزين 10% و 20% على التوالي للفطر *F. solani*، أما من حيث نسب التثبيط فقد تراوحت بين 91.6% و 99.3% عند التركيزين 10% و 20% على التوالي للفطر *R. solani* و 96.3% و 100% عند

جدول 3. تأثير راشح البكتريا *Bacillus subtilis* في تثبيط نمو الفطرين *R. solani* و *F. solani*

اسم الفطر	التركيز	معدل قطر المستعمرة (ملم)	% للتثبيط
<i>R. solani</i>	0	51.6c	0
	10	4.5b	91.6a
	20	1.8a	99.3b
<i>F. solani</i>	0	44b	0
	10	0.5a	96.3b
	20	0a	100b

الحروف المختلفة ضمن الفطر الواحد تعني وجود فروق معنوية

- 3-Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey England. 237 pp.
- 4-Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
- 5-El-Ghaouth A., L. W. Charles and M. Wisniewski. 1998. Ultrastructural and cyto chemical aspects of the biological control of *Botrytis cineria* by *Candida sanitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88 : 282-291.
- 6-Fiddman P. J. and S. Rossall. 1995. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizoctonia solani* in oil seed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathology* 44: 695-703.
- 7-Filippi C., Bagnoli G. and G. Picci. 1992. Preliminary studies on the antimycotic activity of a molecule secreted by *Bacillus subtilis* M 51. *Agricultural mediterranea* 122:164-169.
- 8-Kawchuck, L. M., J. D. Holly, D. R. Lynch and R. M. Clear. 1994. Resistance to thiabendazole and thiophanate-methyle in Canadian isolates of *Fusarium sambucinum* and *Helminthosporium solani*. *American Potato Journal* 71:185-192.
- 9-Kim, D. S., R. J. Cook and D. M. Weler. 1997. *Bacillus* sp. L 32492 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
- 10-Montealegre, J. R., R. Reyes, R. L. M. Peres, R. Herrera, P. Silva and X. Besoain. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Environmental Biotechnology* 6(2).
- 11-Perez, L. M., X. Besoain, M. Reyes, G. Pardo and J. Montealegre. (2002) The expression of extracellular fungal cell wall hydrolytic enzymes in different *Tricoderma harzianum* isolates correlate with their ability to control *Pyrenochaeta lycopersici*. *Biological Research* 35(3): 401 - 410.
- 12-Secor, G. A., J. Rodriguez and N.C. Gudmested. 1994. Distribution and incidence of benzimidazole-resistant *Fusarium sambucinum* and *Helminthosporium solani* isolated from potato in North America. In: BCPC Monograph 60: Fungicide resistance, British Crop Protection Council, England, pp. 271-274.
- 13-Singh V. and B. J. Deverall. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against the نتائج التي أوضحتها هذه الدراسة تؤكد التأثير التثبيطي للبكتريا *Bacillus subtilis* ضد عدد من الفطريات الممرضة للنبات وقد كان هذا التثبيط على مستوى المزرعة البكتيرية الكاملة من جهة وعلى مستوى الراشح البكتيري من جهة أخرى ، فقد أظهرت الأطباق المتفحة بالبكتريا مع الفطر على الوسط N.A وجود هالة واضحة وتثبيطاً معنوياً في نمو الفطريات الثلاث *F. solani*، *R. solani* و *F. oxysporum* ، حيث لم يحصل أي تلامس بين البكتريا وكل من هذه الفطريات الثلاث حتى بعد 7 أيام من عملية التلقيح وهذا يعني ان الية التضاد antagonistic mechanism تتمثل بإفراز البكتريا للايضات الانتشارية والطيارة وهذا ما أكدته Perez وآخرون (11) .
- ان ظهور الحالة التثبيطية عزز الاعتقاد بأن البكتريا قد أفرزت أيضاً مثبطة للفطريات Fungi static metabolites حيث أشارت دراسات سابقة بأن البكتريا *B. subtilis* تستطيع أن تفرز عدة أيضاً مضادة للفطريات مثل bacitracin، subtiline ، bacillin ، و bacillomycin والتي تعود إلى مجموعة ال-Iturine (2) .
- من خلال الجدولين 1 و 2 يتضح أن نسب التثبيط على الوسط PDA أقل مما هي عليه على الوسط N.A ربما يعود السبب الى كون الوسط PDA أكثر ملائمة لنمو فطريات الدراسة من الوسط N.A ومع ذلك فقد أظهرت البكتريا وراثتها تثبيطاً معنوياً ضد فطريات الدراسة الثلاث على الوسط PDA.
- توفر أنواع البكتريا *Bacillus* منافع عديدة من بين بقية البكتريا، وذلك بسبب قدرتها على البقاء لمدة طويلة وقابليتها على تكوين الأبواغ الداخلية endospores ونشاطها الواسع في إنتاج المضادات الحياتية (6) .

المصادر

- 1-الناصرى ، سارا قحطان سسليمان. 2001. المقاومة الإحيائية لبعض فطريات تعفن جذور القرنفل وموتها بواسطة أنواع الفطر *Tricoderma*. رسالة ماجستير- كلية العلوم للنبات -جامعة بغداد. 2001.
- 2-Alippi , A. and C. Monaco 1994. Antagonismo in vitro de especies de *Bacills* contra *Seclerotium rolsii* *Fusarium solani*. *Revesta de la Facultad de Agronomia, La plato*. 70 : 91-95.

- Journal of Applied Microbiology 84: 791-801.
- 15-Yuen, G. Y., M. N. Schroth and A. H. Maccain. 1985. Reduction of fusarium wilt of carnation with suppressive soil and antagonistic bacteria. Plant Disease 69: 1071-1075.
- 14-Walker R., A. A. Powel and B. Seddon. 1998. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cineria* and *Pythium* species. fungal pathogens of citrus fruit. Transactions of British Mycological Society 83 : 487-490.